

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Chylíková

Syntéza 9-deazaguaninových derivátů jako potenciálních  
inhibitorů tRNA-guanin transglykolázy (TGT)

Synthesis of 9-deazaguanine derivatives as potential inhibitors of  
tRNA-guanine transglycosylase (TGT)

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Michal Hocek, CSc., DSc.

Praha 2020

Tato práce byla vypracovávána na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. a Katedře organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, v Praze, od října 2018 do května 2020.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. 5. 2020

Barbora Chylíková

## Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Michalu Hockovi, za příležitost podílet se na práci v jeho výzkumné skupině. Dále upřímně děkuji Dr. Michalu Tichému především za jeho neuvěřitelnou trpělivost, za cenné rady v laboratoři i při psaní této práce a za pomoc ve složitých chvílích. Děkuji také všem členům laboratoře B 3.14 na ÚOCHB za rady a ochotu, a také členům týmu hmotnostní spektrometrie za změření všech spekter. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu po celou dobu mého studia.

# Abstrakt

Shigelóza je akutní průjemové onemocnění, způsobené enterobakteriemi rodu *Shigella*. V celosvětovém měřítku jsou tyto bakterie zodpovědné za zhruba 1 milion úmrtí ze 165 milionu případů onemocnění ročně, z čehož jsou nejnáchylnější skupinou děti do 5 let pocházející z rozvojových zemí.

Enzym tRNA-guanin transglykoláza (zkráceně TGT) byl identifikován jako esenciální pro účinnou patogenezí bakterií rodu *Shigella*, a proto se stává potenciálním cílem pro selektivní léčbu shigelózy.

Tato bakalářská práce popisuje optimalizaci přípravy klíčového intermediátu pro syntézu potenciálních inhibitorů TGT založených na 8-aryl-9-deazaguaninové struktuře, jejichž syntéza vychází z komerčně dostupného 2,6-dichlor-9-deazapurinu. Hlavními kroky syntézy jsou hydrolýza v pozici 6, nukleofilní aromatická substituce chlorové skupiny za amino skupinu v pozici 2, dále jodace a napojení 3-thienylové skupiny na pozici 8 pomocí Suzukiho couplingu.

**Klíčová slova:** heterocykly, deazaguaniny, inhibitory enzymů

# Abstract

Shigellosis is an acute diarrheal disease caused by enterobacteria of the genus *Shigella*. Worldwide, these bacteria are responsible for about 1 million deaths out of 165 million cases of the disease yearly, of which children under the age of 5 from developing countries are the most vulnerable group.

The enzyme tRNA-guanine transglycolase (TGT for short) has been identified as essential for the effective pathogenesis of *Shigella* bacteria and therefore becomes a potential target for the selective treatment of shigellosis.

This bachelor thesis describes the optimization of the preparation of a key intermediate for the synthesis of potential TGT inhibitors based on 8-aryl-9-deazaguanine structure. The synthesis starts from commercially available 2,6-dichloro-9-deazapurine. The main steps of the synthesis are the hydrolysis at position 6, the nucleophilic aromatic substitution of the chlorine group for the amino group in position 2, further the iodation and the introduction of the 3-thienyl group in position 8 by Suzuki coupling.

**Key words:** Heterocycles, Deazapurines, Enzyme inhibitors

## Seznam použitých zkratk

CDCl <sub>3</sub>	Deuterovaný chloroform
cHex	Cyklohexan
d	Dublet
dd	Dublet dubletů
DCM	Dichlormethan
DMAC	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublet tripletů
EA	Ethyl-acetát
EHP	Evropský hospodářský prostor
ESI	Elektrosprejová ionizace
HFIP	Hexafluoropropan-2-ol
HPFC	Vysokoúčinná tlaková chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR	Vysoké rozlišení (z angl. High resolution)
LDA	Diisopropylamid lithný
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
NADPH	Nikotinaminadenindinukleotidfosfát
NaOtBu	Terc-butoxid sodný
NMR	Nukleární magnetická rezonance
p.a.	Pro analýzu
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	[1,1'-Bis-(difenylfosfino)ferocen]palladium(II) dichlorid
PhSO <sub>2</sub> Cl	Benzensulfonylchlorid
rel.	Relativní
s	Singlet
SAR	Vztah mezi strukturou a aktivitou (z angl. Structure-activity relationship)
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chlorid
TFA	Trifluoroctová kyselina

TGT	tRNA-guanin transglykoláza
THF	Tetrahydrofuran
TMBE	Methyl-terc-butylether
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World health organization)

# Obsah

1	Teoretický úvod.....	9
1.1	Shigelóza.....	9
1.1.1	Etiologie .....	9
1.1.2	Epidemiologie.....	10
1.1.3	Patogeneze .....	10
1.1.4	Klinické příznaky .....	11
1.1.5	Současné léčebné metody .....	11
1.2	tRNA-Guanin Transglykoláza (TGT).....	12
1.2.1	tRNA modifikace v pozici 34.....	12
1.2.2	Queuosin.....	14
1.2.3	tRNA-guanin transglykosyláza jako cíl pro léčbu shigelózy .....	15
1.3	Prozatím známé inhibitory .....	17
1.3.1	2-aminochinazolin-4(3 <i>H</i> )-ony .....	17
1.3.2	<i>lin</i> -benzopuriny.....	18
1.3.3	Design dalších potenciálních inhibitorů .....	19
2	Cíl práce .....	20
3	Výsledky a diskuze.....	21
3.1	Strategie syntézy .....	21
3.2	Výsledky .....	24
4	Závěr.....	28
5	Experimentální část.....	29
5.1	Obecné informace .....	29
5.2	Syntéza cílových sloučenin.....	30
6	Seznam použité literatury.....	36



# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Shigelóza

Shigelóza (z anglického Shigellosis) nebo také **bacilární úplavice** (bakteriální dysenterie) je vysoce nakažlivé, akutní průjemové onemocnění, způsobené enterobakteriemi rodu *Shigella*. Střevní infekce je spojena se silnými křečemi v břiše a horečkou, inkubační doba je zpravidla od 1 do 4 dnů. Nemoc obvykle vymizí sama v průběhu 4 až 8 dnů, průběh infekce však bývá spojen s typickou příměsí krve a hlenu ve stolici.<sup>1</sup> V celosvětovém měřítku jsou bakterie rodu *Shigella* zodpovědné za zhruba 1 milion úmrtí ze 165 milionu případů bacilární úplavice ročně. Nejnáchylnější skupinou na toto onemocnění jsou děti do 5 let, pocházející z rozvojových zemí.<sup>2</sup>

### 1.1.1 Etiologie

Bakterie rodu *Shigella* jsou gramnegativní, nepohyblivé, nesporulující, tyčinkovité, fakultativní anaerobové. Tento rod bakterií je úzce příbuzný s bakteriemi *Escherichia coli*.<sup>3</sup>

Dle současné oficiální taxonomie dělíme tento rod bakterií na čtyři sérotypy, a to: *S. dysenteriae* (Shigelóza skupiny A), *S. flexneri* (Shigelóza skupiny B), *S. boydii* (Shigelóza skupiny C) a *S. sonnei* (Shigelóza skupiny D).<sup>4</sup> Všechny čtyři sérotypy jsou schopny způsobit nemoc u člověka, ovšem za drtivou většinu infekcí jsou zodpovědné pouze tři z nich. Sérotyp *S. flexneri* způsobuje endemickou formu shigelózy převážně u dětí v rozvojových zemích, zatímco sérotyp *S. sonnei* je obecně spojován s nemocemi v subpopulacích průmyslových a středně rozvinutých zemí.<sup>5</sup> Na rozdíl od ostatních sérotypů, je *S. dysenteriae* jediným produkujícím tzv. Shiga-toxin, tudíž je známý jako „Shiga bacillus“. Infekce způsobena tímto sérotypem může způsobit závažné klinické onemocnění s nebezpečnými komplikacemi právě kvůli expresi Shiga-toxinu.<sup>6</sup> Tento toxin produkují i některé druhy *E. coli*, což způsobilo pandemii v Německu v roce 2011, kdy onemocnělo 4 000 lidí a 50 jich podlehl.<sup>7</sup> Poslední sérotyp bakterie *S. boydii* je spojován s minimem případů shigelózy (okolo 6 %) a vyskytuje se stejně jako *S. flexneri* typicky v zemích třetího světa.<sup>8</sup>

### 1.1.2 Epidemiologie

Situace se zlepšila od roku 1990, kdy bylo na základě systematického průzkumu o výskytu průjmových onemocnění u hospitalizovaných zjištěno, že rod *Shigella* má na svědomí více jak 1,1 milionu úmrtí za rok, z toho 61 % tvořily právě děti do 5 let.<sup>8</sup> V roce 2013 byly tyto odhady revidovány pomocí podobné modelovací strategie a bylo zjištěno, že mortalita u dětí do 5 let klesla na 28 000 až 48 000 ročně.<sup>9, 10</sup> V roce 2016 byla provedena kvantitativní molekulární analýza ze studie Global Enteric Multicentre Study (GEMS). Ta identifikovala nárůst shigelózy a uvedla ji jako jeden z šesti nejdůležitějších patogenů, které způsobují dětský průjem.<sup>11</sup>

V Evropě není shigelóza často se vyskytujícím onemocněním. V roce 2016 bylo potvrzeno pouze 5 631 případů onemocnění ve 29 zemích EHP, což je 1,5 případu na 100 000 lidí. Shigelóza v EHP dále vykazuje sezónní charakter s vrcholem v pozdním létě a brzkém podzimu, což může být vysvětleno návratem obyvatel z dovolených.<sup>12</sup>

### 1.1.3 Patogeneze

Shigelóza je velice nakažlivá nemoc, a to hned z mnoha důvodů. Zaprvé, bakterie rodu *Shigella* se mohou přenášet vodou, kontaminovaným jídlem, mouchami v domácnosti a na neživých objektech, stejně jako kontaktem s nakaženou osobou.<sup>13</sup> Dalším důvodem vysoké nakažlivosti je fakt, že inokulační dávka způsobující infekci, může být pouze 10 – 100 jedinců, a navíc bakterie umí přežít v kyselém prostředí žaludečních šťáv.<sup>14</sup>

Po infikování organismu bakterie pronikají ze žaludku do ilea, tlustého střeva až konečníku. Množit se obvykle začínou v tlustém střevě, kde také hubí konkurenční střevní mikroflóru.<sup>15</sup> Způsobují akutní krvavý průjem invazí do střevního epitelu, kde se uvolňují protizánětlivé cytokiny. Následující zánětlivá reakce ničí epitelární buňky sliznice tlustého střeva a umožňuje tak další přímou invazi *Shigelly*. Výsledný infekční průjem je spojen s velkou ztrátou vody a elektrolytů, křečemi v břiše, horečkou a krvavou, mukoidní stolicí.<sup>13</sup>

#### 1.1.4 Klinické příznaky

Inkubační doba shigelózy se pohybuje od 1 do 4 dnů. Nejběžnější projev nemoci je vodnatý průjem, který však není rozeznatelný od ostatních virových, bakteriálních či protozoálních infekcí indukujících sekreční aktivitu střevních epitelárních buněk.<sup>15, 16, 17</sup>

U dospělých onemocnění obvykle vymizí spontánně - mírné případy za 4 až 8 dní, závažné případy za 3 až 6 týdnů. K významné dehydrataci a ztrátě elektrolytů při cirkulačním kolapsu a smrti dochází hlavně u oslabených dospělých a dětí mladších 2 let.<sup>16, 17</sup>

U dětí se inkubační doba pohybuje od 1 do 7 dnů, ale obvykle se jedná o 3 dny. U malých dětí dochází k náhlému nárůstu horečky, podrážděnosti, ospalosti, nechutenství, nevolnosti, zvracení, průjmu, bolesti břicha a tenesmu. Krev, hnis a hlen se mohou ve stolici objevit do tří dnů. Ztráta hmotnosti a dehydratace se mohou stát ohrožujícími faktory a při zanedbání následků může nastat smrt do 12 dnů.<sup>2, 16</sup>

Závažnost onemocnění se liší podle séroskupiny bakterie. *S. sonnei* obvykle vede k mírnému onemocnění, pravděpodobně omezenému na vodnatost a průjem, zatímco *S. flexneri* obvykle způsobuje silné příznaky bacilární úplavice. Sérotyp *S. dysenteriae* způsobuje závažnější průběh nemoci, což zapříčiňuje již uvedený Shiga-toxin.<sup>2</sup>

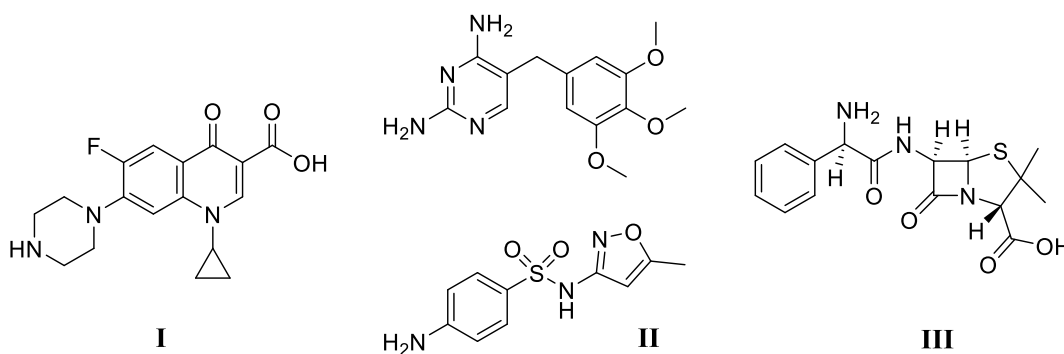
#### 1.1.5 Současné léčebné metody

První krok léčby shigelózy je stejný jako u všech ostatních průjmových onemocnění, a to je včasná orální, popřípadě intravenózní rehydratace a doplnění života potřebných elektrolytů. Předchází se tím izotonické dehydrataci, ztrátě draslíku a metabolické acidóze. Dle pokynů WHO by včasné orální nahrazení tekutin mělo být dostačující terapií. Pokud však infikovaný prodělal šok a vyskytuje se u něj těžká dehydratace a zvracení, je nutné přistoupit k intravenóznímu způsobu rehydratace.<sup>17, 18</sup>

Antibiotika nejsou standardní léčbou shigelózy, jelikož si rod *Shigella* velmi dobře vytváří rezistenci.<sup>2, 19</sup> Zda bude pacient antibiotiky léčen záleží na věku, stavu jeho imunitního systému, závažnosti infekce a pravděpodobnosti dalšího přenosu onemocnění.<sup>16</sup> Léčba antibiotiky zmírňuje příznaky, zkracuje průměrnou dobu trvání

nemoci z 5-7 dnů na 3, a dále také zkracuje dobu, po kterou můžou být bakterie kultivovány ze stolice pacienta.<sup>18, 19</sup>

Při velice závažných případech se antibiotika volí jako léčebná terapie proti shigelóze. Jak bylo již zmíněno, kvůli velké rezistenci je však pouze omezené spektrum druhů antibiotik, co se nabízí k použití. Jedny z příkladů jsou ciprofloxacin (Obrázek 1, **I**), který se používá především v Asii a Severní Americe<sup>20,21</sup>, trimethoprim-sulfamethoxazol (Obrázek 1, **II**) v Indii<sup>22</sup> a ampicilin (Obrázek 1, **III**) v Izraeli.<sup>23</sup>



**Obrázek 1:** Příklady antibiotik, které se užívají v léčbě proti shigelóze.

Je třeba zdůraznit, že pacienti trpící shigelózou by neměli užívat protiprůjmové léky jako je například Imodium, jelikož tyto typy léků mohou příznaky ještě zhoršit.<sup>24</sup>

Navzdory tomu, že je výzkum v procesu, prozatím neexistuje žádná specifická vakcína proti shigelóze ani dostatečně účinný lék v podobě antibiotik.<sup>25</sup>

## 1.2 tRNA-Guanin Transglykoláza (TGT)

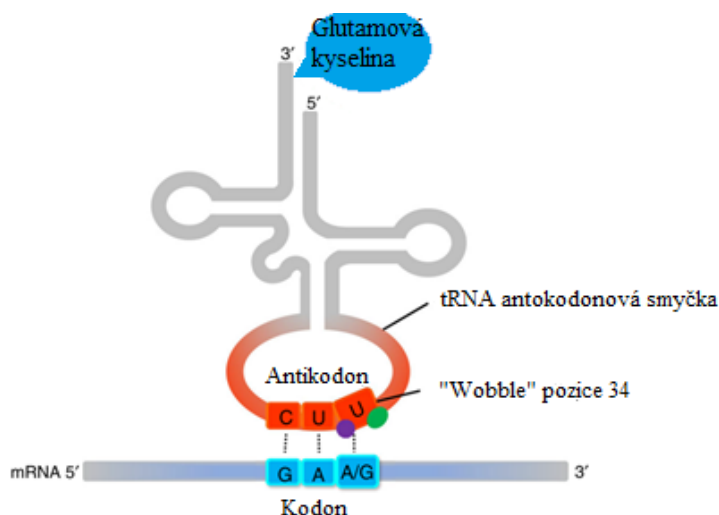
### 1.2.1 tRNA modifikace v pozici 34

Transferové RNA interagují se širokou škálou molekul, jako jsou například amino-acyl-tRNA syntetázy, elongační faktory nebo ribosomální proteiny. Toto rozsáhlé množství biomolekul je možným důvodem vysoké frekvence modifikací nukleosidů.<sup>26</sup> První modifikovaná RNA byla identifikována v roce 1957,<sup>27</sup> po objevení tRNA v témže roce bylo izolováno mnoho dalších modifikovaných nukleosidů jako například methylovaný guanin v roce 1959.<sup>28</sup> Do roku 2014 se počet modifikovaných

nukleosidů v RNA z různých organismů zvýšil na číslo 112, z toho jich 105 obsahuje tRNA.<sup>29</sup>

Zatímco chemická diverzita a komplexnost ribonukleotidových modifikací jasně indikuje jejich důležitost, jsou mechanismy těchto přírodních procesů velmi chabě prozkoumány. Bylo však zjištěno, že počet modifikací tRNA v pozicích 34 a 37 je nápomocný pro funkci dekódování mRNA, protože má přímý vliv na interakce kodon-antikodon mezi tRNA a mRNA.<sup>30, 31, 32</sup>

Podle takzvané Wobble hypotézy, navržené Crickem v roce 1966,<sup>33</sup> se první dva páry bází v pozicích 35 a 36 tRNA párují výhradně kanonicky na kodon odpovídající mRNA za vzniku požadovaného purin-pyrimidinového páru [Uracil(U)-adenin(A) a cytosin(C)-guanin (G)]. K dosažení komplexnosti a selektivity je interakce v pozici 34 uvolněnější a umožňuje tak nestandardní párování bází, což vede ke vzniku tRNA, která umí přečíst víc nežli jeden synonymní kodon (Obrázek 2). Vysoký počet modifikací v pozici 37 a ve „wobble“ pozici 34 tRNA je zásadní pro provedení celé sady antikodonové chemie a pro vytvoření struktur pro úspěšné dekódování genomu.<sup>34</sup> Termodynamická stabilita, stohování bází a preorganizace antikodonové smyčky jsou řízeny specifickými modifikacemi v této doméně.<sup>35</sup>

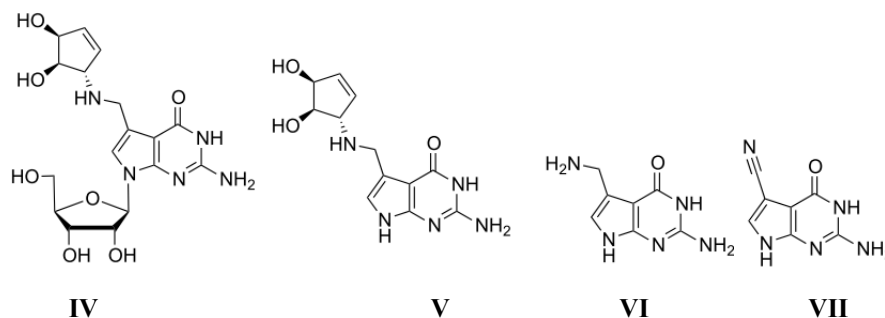


**Obrázek 2:** Znázornění modifikovaného párování bází na tzv. „wobble“ pozici.<sup>36</sup>

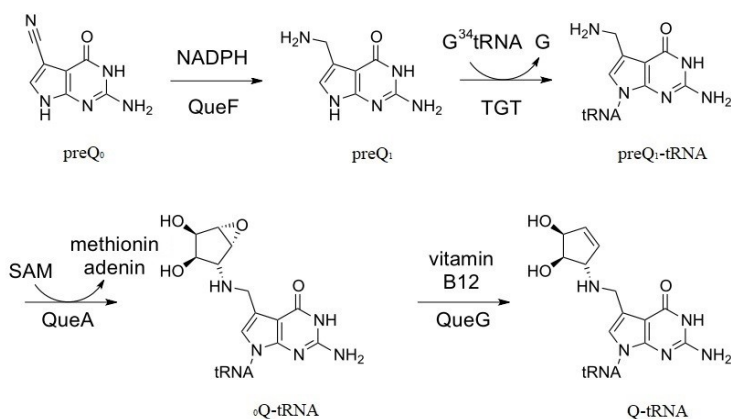
### 1.2.2 Queuosin

Hypermodifikovaný nukleosid queuosin (Q, Obrázek 3, **IV**; báze je označována jako queuin, Que, Obrázek 3, **V**) je přítomen v bakteriích i eukaryotách na „wobble“ pozici a skládá se ze 7-aminomethyl-7-deazaguaninu vázaného prostřednictvím aminoskupiny na cyklopentendiolovou jednotku.<sup>26</sup> Tato molekula je jedinečná ze všech známých modifikovaných bází z toho důvodu, že její prekurzor 7-(aminomethyl)-7-deazaguanin (preQ<sub>1</sub>, Obrázek 3, **VI**) je syntetizován nezávisle na tRNA. Výpočetní modelování Q ve strukturách tRNA odhaluje potenciální stabilizační funkce při tvorbě vazby kodon-antikodon s mRNA.<sup>37</sup>

Vícestupňová biosyntéza Q vychází z guanosintrifosfátu (GTP)<sup>38</sup>, kdy za pomoci několika enzymů a kofaktorů dostáváme 7-kyano-7-deazaguanin (preQ<sub>0</sub>, Obrázek 3, **VII**).<sup>39</sup> Za využití reduktázy a za přítomnosti NADPH dochází k redukci nitrilové skupiny a získá se tak prekurzor preQ<sub>1</sub>.<sup>40</sup> Nyní přichází na řadu enzym tRNA-guanin transglykoláza, který katalyzuje výměnu guaninu na „wobble“ pozici 34 tRNA antikodonu s modifikovanou bází preQ<sub>1</sub> za vzniku preQ<sub>1</sub>-tRNA.<sup>41</sup> Tento mechanismus se vyskytuje výhradně u prokaryot, eukaryota se vyznačují odlišným průběhem.<sup>42</sup> Dále se katalyticky naváže na aminoskupinu báze preQ<sub>1</sub> cyklopentendiolepoxid a finálním krokem biosyntézy queuosinu je katalyzovaná eliminace na cyklopentendiol za přítomnosti vitamínu B<sub>12</sub> (Schéma 1).<sup>43</sup>



**Obrázek 3:** Struktury queuosinu **IV**, queuinu **V**, preQ<sub>1</sub> **VI** a preQ<sub>0</sub> **VII**.<sup>26</sup>



**Schéma 1:** Bakteriální biosyntéza queuosinu.<sup>26</sup>

### 1.2.3 tRNA-guanin transglykosyláza jako cíl pro léčbu shigelózy

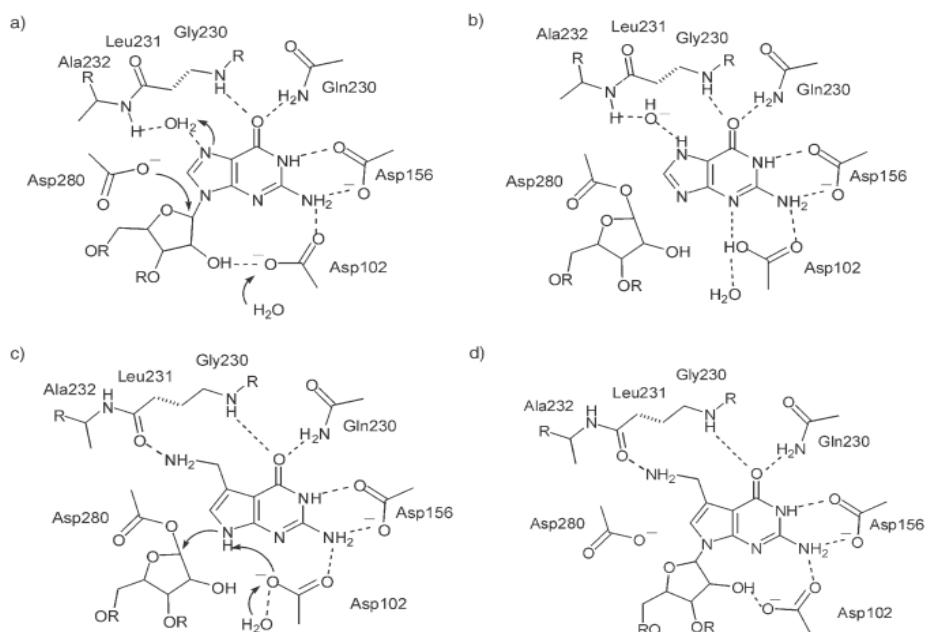
Bakteriální enzym tRNA-guanin transglykoláza (TGT) katalyzuje, jak již bylo uvedeno výše, výměnu guaninu za modifikovaný prekursor báze queuninu preQ<sub>1</sub> na antikodonové pozici 34 („wobble“ pozici) tRNA.<sup>44</sup> Tato pozice je specifická pro aminokyseliny Asn, Asp, His a Tyr a je charakterizována antikodonovou sekvencí G<sup>34</sup>U<sup>35</sup>N<sup>36</sup> (N = A, U, C nebo G).<sup>41, 45</sup> Tyto tRNA sdílejí společnou U<sup>33</sup>G<sup>34</sup>U<sup>35</sup> sekvenci, která slouží jako rozpoznávací sekvence pro TGT.<sup>46</sup>

Invazivní mechanismus *S. flexneri* je dnes již dobře prozkoumán rozsáhlými studiemi vedoucími k podrobnému porozumění patogenu.<sup>47</sup> Charakterizace chromozomálních mutací bakterie vedla k identifikaci genu **vacC**, který významně přispívá k patogenitě.<sup>48</sup> Nukleotidová sekvence genu vacC je vysoce homologní s genem **tgt** *E. coli*, který kóduje enzym TGT.<sup>49</sup> V tomto organismu má mutace oblasti vacC za následek sníženou syntézu **virF** proteinu, klíčového regulačního proteinu pro úplnou expresi virulence.<sup>50</sup> Inaktivace genu vacC má za následek signifikantně oslabený fenotyp virulence, což znamená, že enzym TGT je potenciálním řešením pro selektivní léčbu shigelózy.<sup>45, 51</sup>

Jelikož krystalová struktura TGT z *S. flexneri* zatím není k dispozici, používá se jako náhrada velmi podobná a dobře krystalizovatelná TGT ze *Zymomonas mobilis*. Jediný rozdíl mezi těmito enzymy je v jejich aktivních místech, kde se u bakterie *S. flexneri* nachází aminokyselina Phe106, zatímco u *Z. mobilis* Tyr106.<sup>44, 52</sup> Bylo však dokázáno, že tato aminokyselinová záměna nemá významný vliv na vazbu ligandu a katalýzu. Tudiž se tak *Z. mobilis* TGT stává vhodným modelem pro návrh léčiv proti shigelóze.<sup>53</sup>

Enzym TGT provádí katalýzu takzvaným ping-pong mechanismem.<sup>54</sup> Zbytky aminokyselin Asp102 a Asp280 byly identifikovány jako klíčové pro katalytický mechanismus a role Asp280 jako nukleofilu byla prokázána krystalografickými studiemi.<sup>55</sup> První krok mechanismu je zahájen protonací guaninu na atomu N7, čímž se transformuje na dobrou odstupující skupinu. Aminokyselina Asp280 současně napadá glykosidickou vazbu ribózy-34 nukleofilním způsobem, což má za následek štěpení glykosidické vazby C-N a tvorbu kovalentního meziproduktu mezi enzymem a tRNA, která již neobsahuje purinovou bázi (Obrázek 4 a, b). Po rozštěpení, kdy je guanin nahrazen preQ<sub>1</sub> uvnitř vazebné kapsy, je kovalentní komplex TGT–tRNA dezintegrován a mezi atomem N7 na preQ<sub>1</sub> a uhlíkem C1' ribózy je vytvořena N-glykosidická vazba (Obrázek 4 c, d).<sup>26, 46</sup>

Na základě zmíněného ping-pong mechanismu může být každý krok tohoto procesu inhibován samostatně.<sup>45</sup> Pro inhibici prvního reakčního kroku musí inhibitor soutěžit s vazbou molekuly tRNA o vazebné místo enzymu TGT. Struktura inhibitoru je tedy určena vlastnostmi vazebného místa. Inhibitor se musí dostatečně vázat do vazebné kapsy tRNA, aby se zabránilo jejímu rozpoznání. Druhý krok reakce může být také inhibován, neboť kovalentní přidání tRNA k enzymu TGT způsobuje významné snížení prostoru v místě vazebné kapsy. Z tohoto důvodu se do zbývajících oblastí kapsy vejdou pouze inhibitory podobné velikosti jako preQ<sub>1</sub>.<sup>44, 56</sup>



**Obrázek 4:** Předpokládaný ping-pong mechanismus TGT.<sup>46</sup>

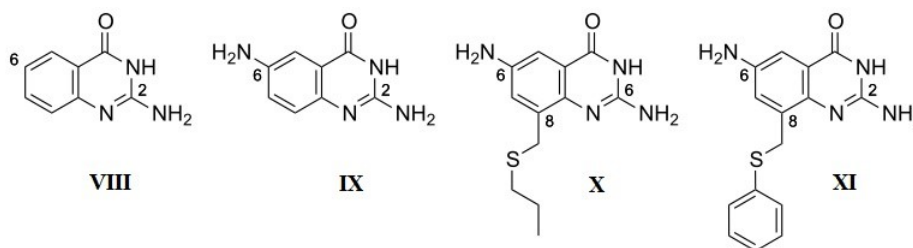


## 1.3 Prozatím známé inhibitory

Více než 15 let výzkumné skupiny pracují na vývoji *de novo* inhibitorů TGT enzymu podle krystalové struktury z bakterie *Z. mobilis*. Soustředují se především na dva hlavní typy sloučenin: 2-aminochinazolin-4(3*H*)-ony and *lin*-benzopuriny.<sup>26</sup>

### 1.3.1 2-aminochinazolin-4(3*H*)-ony

První sada inhibitorů, založených na 2-aminochinazolin-4(3*H*)-onovém jádru, napodobuje síť vodíkových můstků guaninu a preQ<sub>1</sub> s příslušnými aminokyselinovými zbytky enzymu. Navíc aromatický bicyklický systém umožňuje inhibitorům interagovat s aminokyselinami jako je Tyr pomocí  $\pi$ - $\pi$  vazeb a s Met za pomoci  $\pi$ -síra vazby.<sup>57, 58</sup>



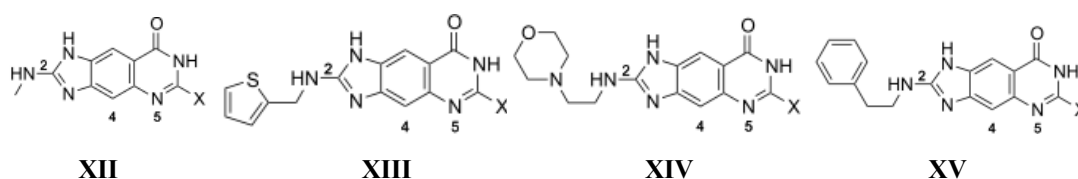
**Obrázek 5:** Struktury inhibitorů založených na 2-aminochinazolin-4(3*H*)-onovém jádru.<sup>26</sup>

Dále bylo pozorováno, že velikost inhibitorů ovlivňuje způsob inhibice. Malé nesubstituované inhibitory jako jsou **VIII** a **IX** (Obrázek 5) se mohou vázat buď na TGT, který je kovalentně vázán na tRNA, po uvolnění guaninu (nekompetitivní), nebo předtím než G<sup>34</sup>-tRNA vstoupí na aktivní místo (kompetitivní). Byly stanoveny odpovídající inhibiční konstanty pro kompetitivní a nekompetitivní inhibici. Substituenty v pozici 8 na aromatickém jádře, jako je tomu například u **X** a **XI** (Obrázek 5), znemožnily nekompetitivní vazbu, tudíž byla vazba považována za čistě kompetitivní.<sup>26,57</sup>

### 1.3.2 *lin*-benzopuriny

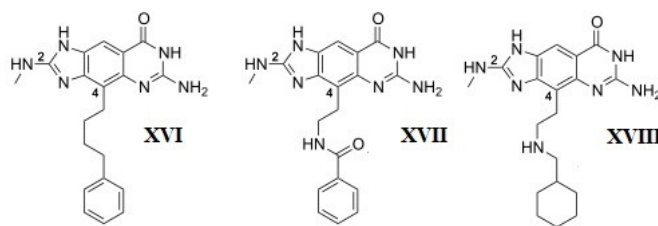
Takzvané *lin*-benzoguaniny nebo *lin*-benzohypoxanthiny byly syntetizovány vložením benzenového kruhu mezi imidazolový a pyrimidinový kruh v purinovém jádru. Dříve již našly uplatnění v medicíně jako inhibitory S-adenosyl-L-homocysteinové (SAH) hydrolázy<sup>59</sup> a fosfodiesterázy typu 5 (PDE5).<sup>60</sup> V případě *Z. mobilis* TGT bylo provedeno několik studií o vlivu substituentů v polohách 2 a 4 zacílených na vazebná místa ribózy-33 a -34, jakož i vlivu exocyklické aminoskupiny v poloze 6.<sup>61, 62</sup>

V roce 2011 byl vysvětlen afinitní rozdíl mezi řadou *lin*-benzoguaninů a *lin*-benzohypoxanthinů s rozsáhlými výsledky z údajů o biologické aktivitě, fyzikálně-chemických testů a rentgenových kokrystalizačních struktur. Bylo zjištěno, že *lin*-benzoguaniny jsou protonovány v aktivním místě (N5), tudíž dojde k vytvoření solného můstku mezi Asp102 a ligandem. *Lin*-benzohypoxanthiny v důsledku jejich snížené hodnoty  $pK_a$ , oproti *lin*-benzoguaninům, zůstávají neutrální a neumožňují kontakt s Asp102.<sup>26, 63</sup>



**Obrázek 6:** Struktury inhibitorů založených na *lin*-benzopurinovém jádře substituovaných v pozici 2, kdy pro *lin*-benzoguaniny se  $X = NH_2$  a pro *lin*-hypoxanthiny se  $X = H$ .<sup>26, 63</sup>

Základní kostru *lin*-benzoguaninu lze dále modifikovat a připojit další substituenty do pozic 2 (Obrázek 6) nebo 4 (Obrázek 7), které tak zaplní kapsy pro ribózu 33/34, čímž lze dále zvýšit aktivitu těchto inhibitorů.<sup>45, 64</sup>

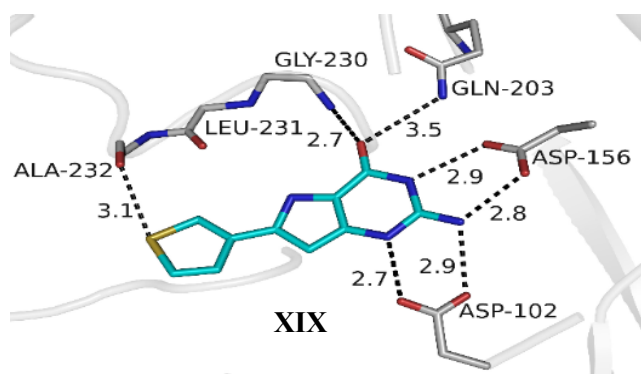


**Obrázek 7:** Struktury inhibitorů založených na *lin*-benzoguaninovém jádře substituovaných v pozici 4.<sup>26, 65</sup>

V posledních několika letech bylo výzkumnými skupinami syntetizováno velké množství nanomolárních *lin*-benzoguaninových inhibitorů vykazujících silnou afinitu k enzymu TGT. Většinou se však nedají aplikovat pro léčebné účely, jelikož nevykazují vhodné farmakokinetické vlastnosti.<sup>66</sup>

### 1.3.3 Design dalších potenciálních inhibitorů

Dalším krokem v dlouhodobé studii vztahu mezi strukturou inhibitorů a jejich aktivitou proti TGT je snaha o přípravu zcela nového typu inhibitorů odvozených od purinového skeletu. Struktury těchto látek byly navrženy s použitím molekulového modelování pomocí programu MOLOC ve spolupráci se skupinou prof. Diederiche z ETH Zurich.<sup>67</sup> Během modelování se rychle ukázalo, že je nezbytné zachovat oxo skupinu v poloze 6 a zároveň amino skupinu v poloze 2. Po optimalizaci byla navržena série 8-aryl-9-deazaguaninů (systematicky 2-amino-6-aryl-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-ony), včetně látky **XIX** (Obrázek 8).



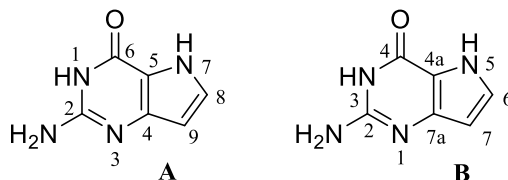
**Obrázek 8:** Struktura 8-aryl-9-deazapurinového inhibitoru, modelováno pomocí programu MOLOC (souřadnice z 2Z7K, rozlišení 1.28 Å).

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je příprava a optimalizace syntézy klíčového intermediátu pro vývoj modulární syntézy 8-aryl-9-deazaguaninů, potenciálních inhibitorů TGT. Vyvinutá syntéza by měla umožňovat syntézu klíčového intermediátu v několikagramovém množství.

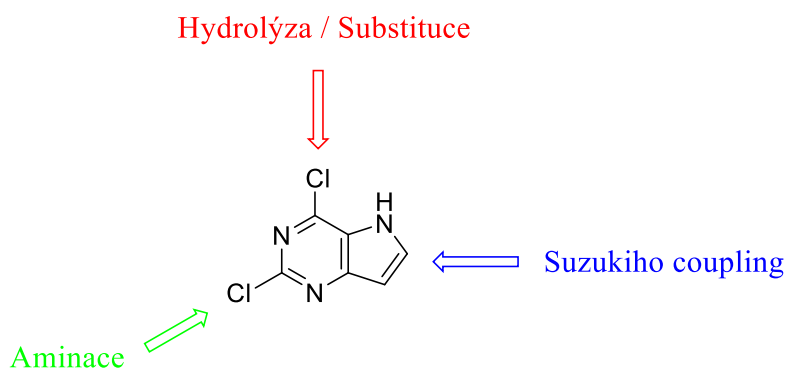
### 3 Výsledky a diskuze

V této kapitole bude používáno semitriviální číslování purinového skeletu (Obrázek 9 A). V kapitole *Experimentální část* bude pro charakterizaci připravených sloučenin používáno číslování dle systematického názvosloví (Obrázek 9 B).



**Obrázek 9:** Číslování 9-deazaguaninového skeletu, kdy **A** je semitriviální purinové a **B** systematické.

#### 3.1 Strategie syntézy



**Obrázek 10:** Strategie syntézy vycházející z 2,6-dichlor-9-deazapurinu.

Na rozdíl od dobře prozkoumaných 7-deazapurinových derivátů je výrazně menší množství známých 9-deazapurinových analogů. Konkrétně 9-deazaguaninové deriváty jako cílové molekuly v této práci se obvykle připravují heterocyklizačními reakcemi.<sup>68</sup> Popsána je však pouze jediná metoda syntézy 8-aryl-9-deazaguaninových derivátů pomocí cyklizačních reakcí,<sup>69</sup> která ale vyžaduje několika krokovou přípravu výchozích látek. Pro přípravu větší série látek pro SAR studii je tak nevhodná. Cílem této práce je vyvinout metodu syntézy 8-aryl-9-deazaguaninů, kdy se arylová skupina bude do molekuly zavádět v co nejpozdější fázi syntézy.

Jako nejvýhodnější výchozí látka se zdá 9-deazaguanin (systematicky 2-amino-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on), jelikož už na sobě má potřebnou aminoskupinu v pozici 2 a ketoskupinu v pozici 6. Jeho nevýhodou je však vysoká polarita a vysoká reaktivita kyselých vodíků sekundárních aminů báze. Vzhledem k rozdílné reaktivitě 9-deazapurinových derivátů při C-H aktivačních reakcích<sup>70</sup> byla zvolena možnost zavedení halogenu do polohy 8 a následný palladiem katalyzovaný Suzukiho coupling. Před touto reakcí by se tedy musely ochránit jak oba vodíky v polohách 1 a 7, tak vodíky aminoskupiny. Tyto pokusy však nevykazovaly vysokou konverzi, výtěžky byly velice malé a produkty se velmi špatně separovaly od výchozí látky.

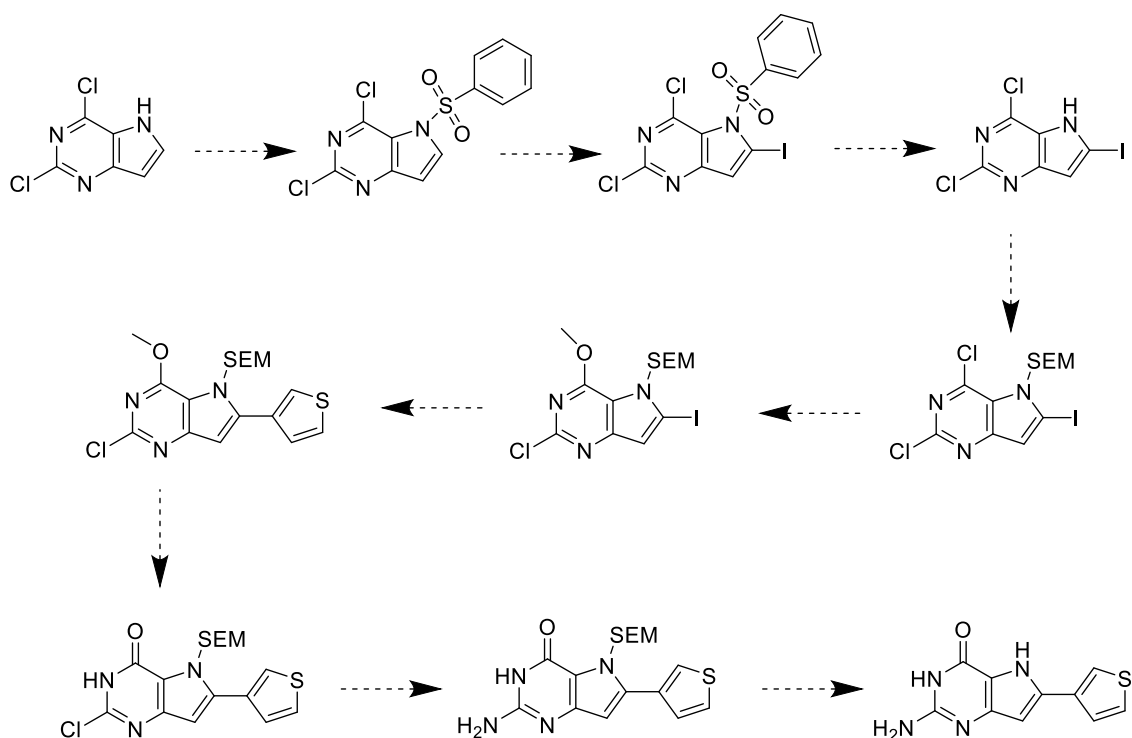
Alternativou je komerčně dostupný 2,6-dichlor-9-deazapurin (systematicky 2,4-dichlor-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin), který je výrazně levnější a vzhledem k nižší polaritě a absenci kyselých vodíků se s ním lépe pracuje (Obrázek 10).

Jak bylo již uvedeno výše, pro Suzukiho coupling je třeba umístit halogen na správnou pozici. Tato látka již obsahuje dvě molekuly chloru v pozicích 2 a 6, a proto byl zaveden atom jodu na pozici 8.<sup>71</sup> Jelikož jod vykazuje vyšší reaktivitu, měl by Suzukiho coupling probíhat přednostně v této pozici.

Molekulu chloru v pozici 6 je třeba zaměnit za keto skupinu, čeho je možné dosáhnout hydrolyzou pomocí silné báze<sup>72</sup> nebo zavedením methoxy skupiny a následnou demethylací. V tomto případě byla zvolena substituce za methoxy skupinu reakcí s methoxidem sodným, jelikož je tak látka méně polární než keton. Z předchozích prací bylo známo, že substituce chloru v pozici 2 probíhá výrazně obtížněji.<sup>73</sup>

Aminaci v pozici 2 lze provést přímou reakcí s amoniakem v tlakové nádobě.<sup>74</sup> Při této reakci je výhodnější mít v pozici 6 ketonovou skupinu, kdyby se zde nacházela methoxy skupina, mohlo by zde též dojít k substituci za amoniak. Alternativní metodou zavedení amino skupiny by mohla být nedávno vyvinutá metoda využívající sekundární amin v hexafluoroisopropanolu (Schéma 2).<sup>75</sup>





**Schéma 3:** Plán syntézy cílové molekuly

2-amino-6-(thiopen-3-yl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-onu.

## 3.2 Výsledky

Syntéza vychází z komerčně dostupného 2,4-dichlor-9-deazapurinu (**1**). Nejprve došlo k ochraně N-7 pomocí benzensulfonylové chránicí skupiny (**c**). Tato protekce je nezbytná, kvůli vysoké reaktivitě kyselého vodíku v pozici 7, který by v dalším kroku znemožnil deprotonaci výrazně méně kyselého vodíku v pozici 8. Díky delokalizovanému systému elektronů benzenového jádra vykazuje benzensulfonylová skupina elektronově akceptorní efekt, tudíž umožňuje deprotonaci pomocí LDA na pozici 8 v deazapurinu. Jako produkt byla obdržena látka **2** s výborným výtěžkem (90 %).<sup>76</sup>

Následně byla provedena jodace (**d**) deazapurinové báze. 9-deazapurin se svojí reaktivitou při C-H aktivacích reakcích liší od 7-deazapurinu<sup>70</sup>, proto byl do polohy 8 nejprve zaveden jod, který umožňuje následnou derivatizaci pomocí palladiem katalyzovaných cross-couplingových reakcí. Jelikož reakce nevykazovala úplnou konverzi, bylo nutno přechistit směs pomocí HPFC. Nízká rozpustnost produktu komplikovala chromatografickou separaci, ani po optimalizaci složení mobilní fáze



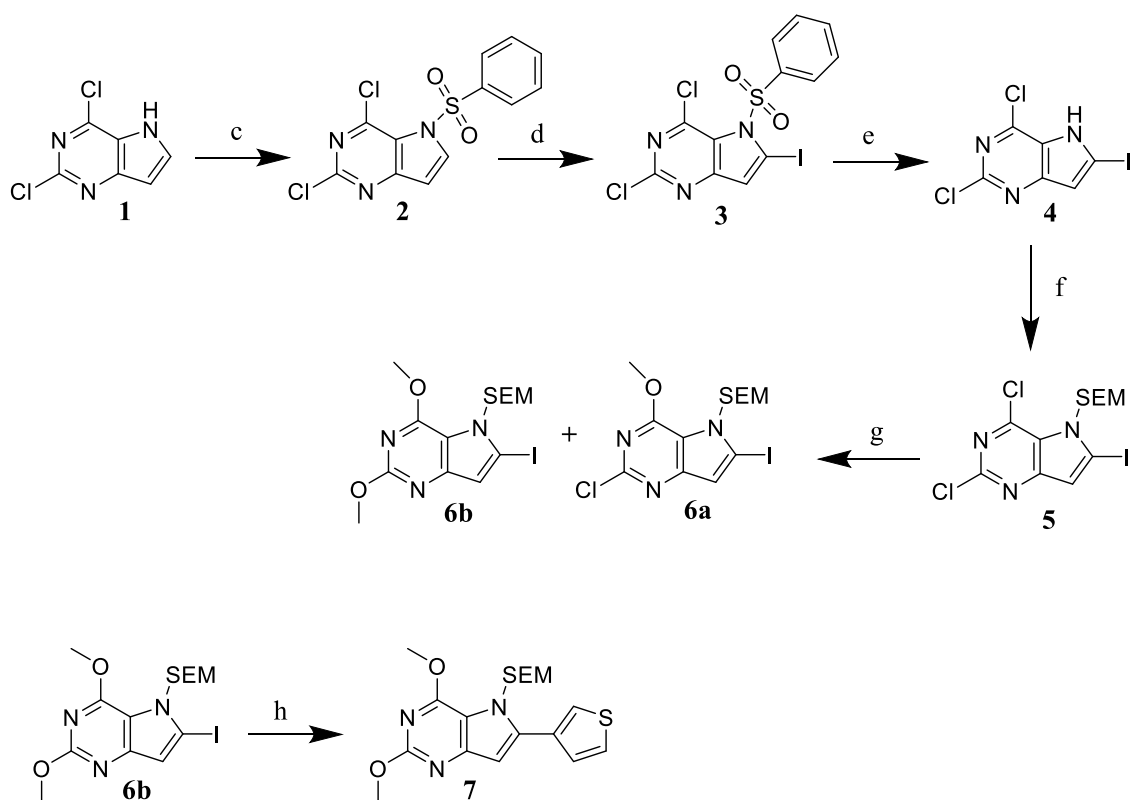
v kombinaci s různými stacionárními fázemi se nepodařilo dosáhnout optimální účinnosti. Kromě kolon, kde byl jako stacionární fáze použit silikagel, bylo nadále použito diolových a kyanových náplní a jako mobilní fáze byla použita kombinace cHex:DCM v různých poměrech s EA. Po optimalizaci separace se podařilo produkt **3** izolovat v dobrém výtěžku (64 %).<sup>77</sup>

Po zkušenostech se Suzukiho couplingem byla na analogicky chráněném 8-jod-7-deazapurinu nejprve odstraněna benzensulfonylová skupina (**e**) z důvodu její nekompatibility s následnými nukleofilními substitucemi. K látce **3** bylo nutno přidat silnou bázi, aby došlo k hydrolýze chránicí skupiny. Po zpracování byla izolována sloučenina **4** s dobrým výtěžkem (77 %).<sup>78</sup>

Dále bylo provedeno chránění sekundárního aminu v purinové bázi 2-(trimethylsilyl)ethoxymethylem (**f**). Tento krok je nutný kvůli zabránění deprotonace báze v následujících reakcích. Chránicí skupina SEM byla vybrána z důvodu stability v bazickém prostředí a nižší polaritě, než vykazuje benzensulfonylová skupina. K látce **4** byl nejprve pomalu přidán NaH a následně 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chlorid. Po izolaci byla získána látka **5** s výborným výtěžkem (91 %).<sup>79</sup>

Následující postup byl původně zamýšlen jako substituce (**g**) chlorové skupiny v pozici šest za methoxy skupinu. Chlor, navázán v pozici dvě, je o mnoho méně reaktivní, tudíž by měl zůstat netknutý, což bylo dříve ověřeno při pokusech o aminaci.<sup>73</sup> Tato substituce zajišťuje regioselektivitu následného Suzukiho couplingu. První pokus této reakce se osvědčil a cílový produkt **6a** byl izolován s výborným výtěžkem (91 %). Při opakování reakce ovšem nevykazovala vysokou konverzi, a tak bylo přidáno více ekvivalentů methoxidu sodného a prodloužena reakční doba, čímž byl získán pouze disubstituovaný derivát **6b**. Tento produkt byl obdržen s relativně nízkým výtěžkem (47 %).<sup>80</sup>

I přesto byla látka **6b** použita jako modelová pro následující krok, Suzukiho reakci v poloze 8 (**h**). Byla zvolena metoda couplingu výchozí látky s 3-thienyl boronovou kyselinou katalyzována palladiovým katalyzátorem v komplexu s 1,1'-bis-(difenylfosfino)ferocenem za přítomnosti K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Z důvodu špatné izolace byl produkt **7** získán s neuspokojivým výtěžkem (19 %). Tento poslední krok syntézy vyžaduje optimalizaci reakčních podmínek, aby bylo možno dosáhnout vyššího výtěžku (Schéma 4).



**Schéma 4:** Syntéza klíčového intermediátu **6a** pro potencionální inhibitor TGT a modelová Suzukiho reakce.

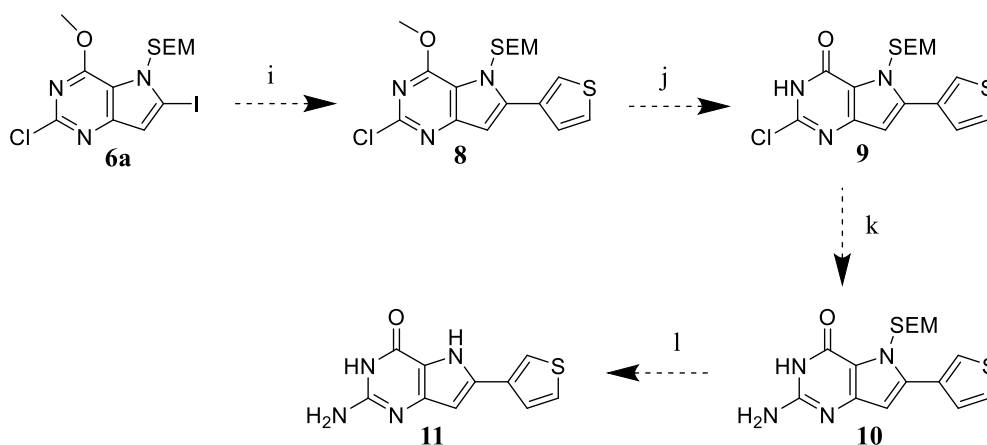
**c:** NaOtBu (1,05 ekv.), PhSO<sub>2</sub>Cl (1,1 ekv.), THF, 0 °C, 2 h; **d:** LDA (2 M, 1,5 ekv.), I<sub>2</sub> v THF (1,3 ekv.), THF, –72 °C, 3 h; **e:** NaOH v MeOH (7 ekv.), THF, laboratorní teplota, 1 h; **f:** NaH 60% (1,1 ekv), SEM (1,1 ekv), DMAC, –5 °C, 45 min; **g:** MeONa (1,5 ekv. / 2,5 ekv.), MeOH, 50 °C, 20 h / 40 h; **h:** 3-thienyl boronová kyselina (1,1 ekv.), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,15 ekv.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2 ekv.), 1,4-dioxan, 80 °C, 16 h.

Následující syntetický plán vychází z intermediátu **6a** a pokračuje Suzukiho couplingem v pozici 8. Jelikož provedená metoda vykazovala tak malý výtěžek, nabízí se několik možností jak upravit reakční podmínky, a tím zvýšit konverzi. Například by mohlo dojít k záměně rozpouštědel a použít místo 1,4-dioxanu dimethylformamid nebo změnit bázi a do reakční směsi přidat K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dále by se nabízela změna palladiového katalyzátoru, upravení teploty či prodloužení reakční doby.

Při následné demethylaci by mohla být použita stejná metoda, jaká byla použita na 7-deazapurinovém skeletu. Jedná se o štěpení methyletheru jodtrimethylsilanem generovaným in situ v acetonitrilu.<sup>70</sup>

Aminace roztokem amoniaku v methanolu v tlakové nádobě při vysoké teplotě (160 °C) byla již otestována v předchozích pracích,<sup>73</sup> tudíž by se měla dát použít i v tomto případě.

Posledním krokem syntetického plánu cílové látky je odstranění chránicí SEM skupiny, což může být provedeno například pomocí triflouroctové kyseliny a následným zavedením vodného roztoku amoniaku do reakční směsi<sup>78</sup> (Schéma 5).



**Schéma 5:** Finální kroky plánu syntézy cílové molekuly

2-amino-6-(thiofen-3-yl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-onu.

**i:** 3-thienyl boronová kyselina, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4-dioxan; **j:** TMSCl, NaI, MeCN;

**k:** roztok amoniaku v MeOH (4 M); **l:** TFA, vodný roztok amoniaku (25%), DCM.

## 4 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vývojem a optimalizací syntézy klíčového intermediátu pro syntézu 9-deazaguaninů nesoucích různé arylové skupiny v poloze 8. Tyto látky byly navrženy jako potenciální inhibitory TGT. Ukázalo se, že reaktivita 9-deazapurinového systému se liší od 7-deazapurinu a ne všechny syntetické metody jsou v tomto případě použitelné. Přesto se přes řadu neúspěšných pokusů podařilo úspěšně provést a optimalizovat jednotlivé reakční kroky plánované syntetické strategie a připravit klíčový intermediát **6a**, který bude dále použit pro syntézu 8-aryl-9-deazaguaninů.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Obecné informace

Všechny reakce byly prováděny ve skleněném nádobí vyžíhaném plamenem a pod ochrannou atmosférou argonu. Všechny výchozí látky byly získány komerčně (firmy Sigma-Aldrich, Fluka, Penta), a není-li uvedeno jinak, nebyly dále zpracovávány ani čištěny. Rozpouštědla použitá ke chromatografiím i k prováděným reakcím byla zakoupena v p.a. kvalitě – výjimky tvoří methanol a voda, jenž byly použity v HPLC kvalitě – a také nebyly dále čištěny. THF (max 0,005% vody) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. sušený na molekulových sítích a uchováván pod septem. Průběh reakcí byl kontrolován na TLC deskách značky TLC Merck Kieselgel 60 F-254, látky byly detegovány pod UV lampou při záření o vlnové délce 254 nm, a následně pomocí Advion Expression Compact Mass Spectrometer spojeným s Plate Express® TLC Plate Reader na základě elektrosprejové ionizace (ESI). Při sloupcových chromatografiích byly kolony plněny Silica gel 60 (Merck). HPFC chromatografie byly prováděny na přístrojích HPFC TELEDYNE ISCO CombiFlash® Rf+ s UV detekcí při 254 nm a 280 nm.

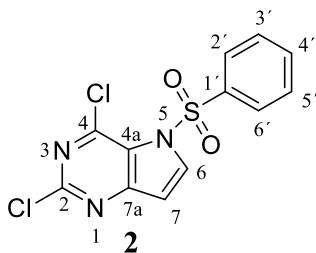
K identifikaci produktů technikou NMR byly použity přístroje BRUKER Ascend™ 400 Prodigy a BRUKER UltraShield™ 400 (400.1 MHz pro  $^1\text{H}$  spektra a 100.6 MHz pro  $^{13}\text{C}$  spektra, platí pro oba přístroje) při 25 °C. Měření probíhalo v kapalně fázi, bylo použito deuteriových komerčně dostupných rozpouštědel DMSO-*d*<sub>6</sub> a CDCl<sub>3</sub>. Chemické posuny byly referencovány vzhledem k signálům rozpouštědel a jsou uvedeny v jednotkách ppm na  $\delta$  stupnici, interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hz. Kompletní přiřazení všech signálů NMR bylo provedeno kombinací měření  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC a  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMBC spekter.

Hmotnostní spektra s nízkým rozlišením byla měřena na přístroji LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific) metodou elektrosprejové ionizace (ESI). Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena na LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Všechna hmotnostní spektra byla dodána MS servisem na ÚOCHB.

Body tání byly měřeny na automatickém bodotávku Stuart SMP40.

## 5.2 Syntéza cílových sloučenin

### 2,4-dichlor-5-(fenylsulfonyl)-5*H*-pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidin (2)



2,4-dichlor-9-deazapurin (5 g; 26,7 mmol; 1 ekv.) a terc-butoxid sodný (2,7 g; 28,1 mmol; 1,05 ekv.) byl suspendován ve 100 ml THF. Reakční směs byla chlazená na 0 °C a za stálého míchání byl po malých dávkách přidán benzensulfonylchlorid (3,75 ml; 29,4 mmol; 1,1 ekv.), ponecháno 2 hodiny reagovat při 0 °C. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Po vytemperování na laboratorní teplotu bylo přidáno malé množství destilované H<sub>2</sub>O, produkt byl extrahován EA (4 × 20 ml) a vysušen bezvodým MgSO<sub>4</sub>. Po zfiltrování byl roztok odpařen do sucha za vakua. Přechištění provedeno pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>, cHex/EA 5 → 20 %). Produkt byl izolován jako bílá pevná látka (7,8 g; 90 %).

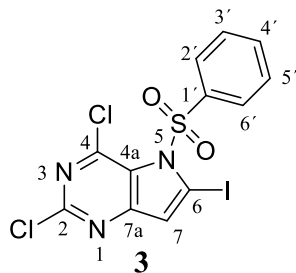
Bod tání: 164 – 165 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz; chloroform-*d*): 6,89 (d; 1H; *J* = 3,8 Hz; H-7); 7,54–7,59 (m; 2H; H-3',5'); 7,66–7,71 (m; 1H; H-4'); 7,85–7,90 (m; 2H; H-2',6'); 8,35 (d; 1H; *J* = 3,8 Hz; H-6).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz; chloroform-*d*): 106,97 (C-7); 123,26 (C-4a); 127,45 (C-2',6'); 129,55 (C-3',5'); 134,77 (C-4'); 137,86 (C-6); 145,03 (C-2); 153,40 (C-4); 158,23 (C-7a); signál pro C-1' byl zakryt interferujícím šumem.

ESI MS *m/z* (rel. %): 350 (100) [*M* + Na]<sup>+</sup>, 328 (12) [*M* + H]<sup>+</sup>; HR MS (ESI) pro C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>S [*M* + H]<sup>+</sup>: vypočteno 327,97088; nalezeno 327,97076.

### 2,4-dichlor-6-jod-5-(fenylsulfonyl)-5*H*-pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidin (3)



Navážka látky **2** (2 g; 6,1 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 30 ml THF a ochlazena na teplotu  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Během 30 minut byl pomalu přidán roztok LDA v THF (4,58 ml; 2 M; 1,5 ekv.) a reakce za stálého míchání probíhala 1 hodinu. Následně byl pomalu během 30 minut přidán roztok jodu v THF (2 g; 8 mmol; 1,3 ekv.), za stálého míchání a chlazení reakce probíhala opět 1 hodinu. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Po uplynutí reakční doby bylo přidáno 10 ml 1M HCl a po vytemperování na laboratorní teplotu 5 ml nasyceného  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Dále byla provedena extrakce EA ( $4 \times 20\text{ ml}$ ) a smíšené organické fáze byly promyty 20 ml nasyceným  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Zbytky vodné fáze byly vysušeny bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a po zfiltrování byl roztok odpařen do sucha za vakua. Vysušená látka byla přečištěna pomocí HPFC ( $\text{SiO}_2$ , cHex/DCM = 1:1/EA 5  $\rightarrow$  25 %). Produkt byl izolován jako nažloutlá pevná látka (1,78 g, 64 %).

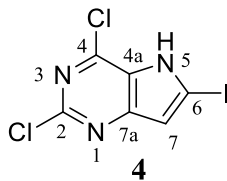
Bod tání:  $178 - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform-*d*): 7,23 (s; 1H; H-7); 7,58–7,64 (m; 2H; H-3',5'); 7,70–7,75 (m; 1H; H-4'); 8,06–8,10 (m; 2H; H-2',6').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, chloroform-*d*): 94,53 (C-6); 124,62 (C-7); 128,15 (C-2',6'); 128,81 (C-4a); 129,67 (C-3',5'); 135,11 (C-4'); 138,21 (C-1'); 146,24 (C-7a); 154,58 (C-2); 159,17 (C-4).

ESI MS  $m/z$  (rel. %): 476 (100)  $[M + \text{Na}]^+$ , 454 (37)  $[M + \text{H}]^+$ ; HR MS (ESI) pro  $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}_2\text{IS}$   $[M + \text{H}]^+$ : vypočteno 453,86752; nalezeno 453,86716.

#### 2,4-dichlor-6-jod-5*H*-pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidin (4)



Navážka látky **3** (1,78 g; 3,9 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna ve 20 ml THF a za stálého míchání byl přidáván roztok NaOH v MeOH (1,1 g; 27,5 mmol; 7 ekv.). Reakce probíhala 1 hodinu za stálého míchání při laboratorní teplotě. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Po uplynutí reakční doby bylo přidáno 5 ml nasyceného NH<sub>4</sub>Cl. Směs byla odpařena do sucha na vakuu, následně rozpuštěna v destilované H<sub>2</sub>O a byla přidávána 1M HCl, dokud nebylo pH = 5. Roztok byl zfiltrován na fritě. Produktem byla bílá krystalická látka (0,95 g, 77 %).

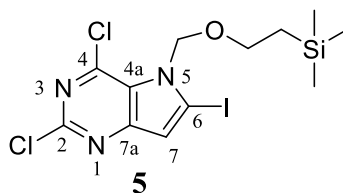
Bod tání: 224 – 226 °C rozpad

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 7,00 (s; 1H; H-7); 13,33 (s; 1H; H-5).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, chloroform-*d*): 89,34 (C-6); 113,99 (C-7); 127,19 (C-4a); 141,69 (C-7a); 151,82 (C-2); 153,74 (C-4).

ESI MS *m/z* (rel. %): 314 (100) [*M* + H]<sup>+</sup>; HR MS (ESI) pro C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>I [*M* + H]<sup>+</sup>: vypočteno 313,87432; nalezeno 313,87436.

#### 2,4-dichlor-6-jod-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (5)



Navážka látky **4** (0,95 g; 3 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna ve 2 ml DMAC a ochlazená na –5 °C. Během 5 minut byl po malých dávkách přidán 60% disperze NaH v minerálním oleji (80,2 mg; 3,3 mmol; 1,1 ekv.) a reakční směs probíhala 15 minut za stálého míchání. 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chlorid (557 mg; 3,3 mmol; 1,1 ekv.) byl pomalu přidán a směs reagovala 30 minut za stálého míchání a teploty –5 °C. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Následně bylo do reakční směsi přidáno 10 ml destilované H<sub>2</sub>O a byla extrahována TMBE (4 × 20 ml). Organické fáze byly smíseny



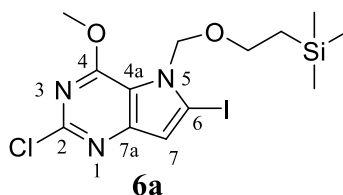
a vysušeny bezvodým MgSO<sub>4</sub>. Směs byla odpařena do sucha na vakuu a následně přečištěna pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>, cHex/DCM 1:1/EA 5 → 25 %). Produktem byla olejová nažloutlá kapalina (1,23 g, 91 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, chloroform-d): -0,07–0 (s; 9H; H-3 × CH<sub>3</sub>); 0,90 (dt; 2H; *J* = 8,2; 6,5 Hz; Si-CH<sub>2</sub>); 3,57–3,65 (t; 2H; O-CH<sub>2</sub>); 5,84 (s; 2H; N-CH<sub>2</sub>-O); 7,02 (d; 1H, *J* = 2,1 Hz; H-7).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, chloroform-d): -1,26 (C-3 × CH<sub>3</sub>); 18,08 (Si-CH<sub>2</sub>); 66,55 (O-CH<sub>2</sub>); 76,84–77,48 (N-CH<sub>2</sub>-O; zakryto signálem rozpouštědla); 99,60 (C-6); 115,04 (C-7); 125,23 (C-4a); 142,34 (C-7a); 151,70 (C-2); 155,48 (C-4).

ESI MS *m/z* (rel. %): 444 (100) [*M* + H]<sup>+</sup>, 466 (35) [*M* + Na]<sup>+</sup>; HR MS (ESI) pro C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ON<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>ISi [*M* + H]<sup>+</sup>: vypočteno 443,95571; nalezeno 443,95608

## 2-chlor-6-jod-4-methoxy-5-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (6a)



Navážka látky číslo **5** (100 mg; 0,2 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 5 ml MeOH a vložena do olejové lázně vyhřáté na 50 °C. Pomalu byl přidán pevný methoxid sodný (18,2 mg; 0,3 mmol; 1,5 ekv.) a reakce se za stálého míchání nechala reagovat 20 hodin za teploty 50 °C. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Odpařeno do sucha na vakuu a následné přečištění provedeno pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>, cHex/EA 0 → 25 %). Produkt byl izolován jako bílá krystalická látka (90 mg, 91 %).

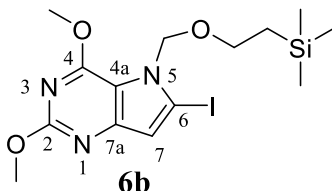
Bod tání: 92 – 93 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, chloroform-d): -0,05 (s; 9H; H-3 × CH<sub>3</sub>); 0,85–0,90 (m; 2H; Si-CH<sub>2</sub>); 3,53–3,58 (m; 2H; O-CH<sub>2</sub>); 4,17 (s; 3H; O-CH<sub>3</sub>); 5,68 (s; 2H; N-CH<sub>2</sub>-O); 6,89 (s; 1H; H-7).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, chloroform-d): -1,27 (C-3 × CH<sub>3</sub>); 17,97 (Si-CH<sub>2</sub>); 54,88 (O-CH<sub>3</sub>); 66,32 (C-CH<sub>2</sub>); 76,84–77,48 (N-CH<sub>2</sub>-O; zakryto signálem rozpouštědla); 93,00 (C-6); 114,66 (C-7); 116,91 (C-4a); 151,30 (C-7a); 153,27 (C-2); 155,42 (C-4).

ESI MS  $m/z$  (rel. %): 462 (100)  $[M + Na]^+$ , 440 (63)  $[M + H]^+$ ; HR MS (ESI) pro  $C_{13}H_{19}O_2N_3ClISi$   $[M + H]^+$ : vypočteno 440,00525; nalezeno 440,00496.

**2,4-dimethoxy-6-jodo-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl-5H-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (6b)**



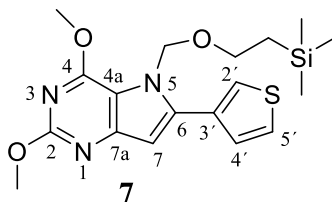
Navážka látky číslo **5** (1,23 g; 2,8 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 10 ml MeOH a vložena do olejové lázně vyhřáté na 50 °C. Pomalu byl přidán pevný methoxid sodný (390 mg; 7,2 mmol; 2,5 ekv.) a reakce za stálého míchání probíhala 40 hodin za teploty 50 °C. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Odpařeno do sucha na vakuu a následné přečištění provedeno pomocí HPFC ( $SiO_2$ , cHex/EA 2 → 30 %). Produkt byl izolován jako jasně žlutá olejovitá kapalina (600 mg, 47 %).

$^1H$  NMR (400 MHz, chloroform-*d*): −0,06 (s; 9H; H-3 × CH<sub>3</sub>); 0,85–0,89 (m; 2H, Si-CH<sub>2</sub>); 3,53–3,57 (m; 2H; O-CH<sub>2</sub>); 4,01 (s; 3H; C2-O-CH<sub>3</sub>); 4,12 (s, 3H; C4-O-CH<sub>3</sub>); 5,65 (s; 2H; N-CH<sub>2</sub>-O); 6,78 (s, 1H; H-7).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, chloroform-*d*): −1,43 (C-3 × CH<sub>3</sub>); 17,85 (Si-CH<sub>2</sub>); 53,89 (C4-O-CH<sub>3</sub>); 54,68 (C2-O-CH<sub>3</sub>); 65,86 (O-CH<sub>2</sub>); 76,84–77,48 (N-CH<sub>2</sub>-O; zakryto signálem rozpouštědla); 90,55 (C-6); 114,11 (C-7); 114,90 (C-4a); 153,13 (C-7a); 156,26 (C-4); 160,35 (C-2).

ESI MS  $m/z$  (rel. %): 436 (100)  $[M + H]^+$ , 458 (13)  $[M + Na]^+$ ; HR MS (ESI) pro  $C_{14}H_{23}O_3N_3ISi$   $[M + H]^+$ : vypočteno 436,05479; nalezeno 436,05471.

**2,4-dimethoxy-6-(thiopen-3-yl)-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-5H-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (7)**



Navážka látky **6b** (300 mg; 0,7 mmol; 1 ekv.) byla smíchána společně s 3-thienyl boronovou kyselinou (97 mg; 0,8 mmol; 1,1 ekv.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (293 mg; 1,4 mmol; 2 ekv.) a [1,1'-bis-(difenylfosfino)ferocen]paladium(II) dichlorid (76 mg; 0,1 mmol; 0,15 ekv.). Vše bylo následně rozpuštěno ve 20 ml suchého 1,4-dioxanu. Reakční směs byla zahřáta na 80 °C a byla míchána po dobu 16 hodin. Konverze byla kontrolována TLC (cHex:EA = 4:1). Po odpaření do sucha na vakuu byla reakční směs přečištěna pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>, cHex/EA 2 → 25 %). Čistý produkt byl izolován jako hnědá olejovitá kapalina (50 mg, 19 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, chloroform-*d*): −0,04 (s; 9H; H-3 × CH<sub>3</sub>); 0,88–0,92 (m; 2H; Si-CH<sub>2</sub>); 3,59–3,63 (m; 2H; O-CH<sub>2</sub>); 4,04 (s; 3H; C2-O-CH<sub>3</sub>); 4,15 (s; 3H; C4-O-CH<sub>3</sub>); 5,66 (s; 2H; N-CH<sub>2</sub>-O); 6,61 (s; 1H; H-7); 7,41 (dd; 1H; *J* = 5,0; 1,4 Hz; H-4'); 7,43 (dd; 1H; *J* = 5,0; 2,9 Hz; H-5'); 7,81 (dd; 1H; *J* = 2,9; 1,4 Hz; H-2').

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, chloroform-*d*): −1,32 (C-3 × CH<sub>3</sub>); 18,21 (Si-CH<sub>2</sub>); 53,83 (C4-O-CH<sub>3</sub>); 54,74 (C2-O-CH<sub>3</sub>); 65,72 (O-CH<sub>2</sub>); 74,32 (N-CH<sub>2</sub>-O); 102,95 (C-7); 113,64 (C-7a); 125,51 (C-2'); 126,39 (C-5'); 128,85 (C-4'); 131,76 (C-4a); 142,05 (C-6); 152,04 (C-3'); 157,47 (C-4); 160,45 (C-2).

ESI MS *m/z* (rel. %): 392 (100) [*M* + H]<sup>+</sup>, 414 (3) [*M* + Na]<sup>+</sup>; HR MS (ESI) pro C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>SSi [*M* + H]<sup>+</sup>: vypočteno 392,14587; nalezeno 392,14567.

## 6 Seznam použité literatury

- 
- (1) Sansonetti, P. J. Rupture, Invasion and Inflammatory Destruction of the Intestinal Barrier by Shigella, Making Sense of Prokaryote-Eukaryote Cross-Talks. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25 (1), 3–14.
  - (2) Muthuirulandi Sethuvel, D. P.; Devanga Ragupathi, N. K.; Anandan, S.; Veeraraghavan, B. Update on: Shigella New Serogroups/Serotypes and Their Antimicrobial Resistance. *Lett. Appl. Microbiol.* **2017**, 64 (1), 8–18.
  - (3) Hale, T. L.; Keusch, G. T. Shigella. In Medical Microbiology. 4th edition; Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, **1996**.
  - (4) Killackey, S. A.; Sorbara, M. T.; Girardin, S. E. Cellular Aspects of Shigella Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, 6, 1–11.
  - (5) Hyams, K. C.; Bourgeois, A. L.; Merrell, B. R.; Rozmajzl, P.; Escamilla, J.; Thornton, S. A.; Wasserman, G. M.; Burke, A.; Echeverria, P.; Green, K. Y. Diarrheal Disease during Operation Desert Shield. *N. Engl. J. Med.* **1991**, 325 (20), 1423–1428.
  - (6) Melton-Celsa, A. R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol. Spectr.* **2014**, 2 (4), 1–13.
  - (7) Marejková, M.; Roháčová, H.; Reisingerová, M.; Petrás, P. An Imported Case of Bloody Diarrhea in the Czech Republic Caused by a Hybrid Enteroaggregative Hemorrhagic Escherichia Coli (EAHEC) O104:H4 Strain Associated with the Large Outbreak in Germany, May 2011. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2012**, 57, 85–89.
  - (8) Kotloff, K. L.; Winickoff, J. P.; Ivanoff, B.; Clemens, J. D.; Swerdlow, D. L.; Sansonetti, P. J.; Adak, G. K.; Levine, M. M. Global Burden of Shigella Infections: Implications for Vaccine Development and Implementation of Control Strategies. *Bull. World Health Organ.* **1999**, 77 (8), 651–666.
  - (9) Kotloff, K. L.; Nataro, J. P.; Blackwelder, W. C. Burden and Aetiology of Diarrhoeal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study. *Lancet* **2013**, 382 (9888), 209–222.

- 
- (10) Lanata, C. F.; Fischer-Walker, C. L.; Olascoaga, A. C.; Torres, C. X.; Aryee, M. J.; Black, R. E. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS One* **2013**, *8* (9), e72788.
- (11) Zhang, C.-L.; Liu, Q.-Z.; Wang, J.; Chu, X.; Shen, L.-M.; Guo, Y.-Y. Epidemic and Virulence Characteristic of *Shigella* Spp. with Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14* (260), 1–9.
- (12) European Centre for Disease Prevention and Control: *Annual Epidemiological Report Shigellosis* [online]. Dostupné z URL: <[https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2016-shigellosis.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2016-shigellosis.pdf)> [cit. 18. 3. 2020]
- (13) DW, A. A. of P. P. infections. I. K.; Brady MT, Jackson MA, L. S. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. *Am. Acad. Pediatr.* **2018**.
- (14) Schroeder, G. N.; Hilbi, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* Spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21* (1), 134–156.
- (15) Kotloff, K. L.; Riddle, M. S.; Platts-Mills, J. A.; Pavlinac, P.; Zaidi, A. K. M. Shigellosis. *Lancet* **2018**, *391* (10122), 801–812.
- (16) MSD Manual Professional Version: *Infectious Diseases – Shigellosis* [online]. Dostupné z URL: <<https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-negative-bacilli/shigellosis>> [cit. 19. 3. 2020]
- (17) Centers for Disease Control and Prevention: *Shigella – Shigellosis* [online]. Dostupné z URL: <<https://www.cdc.gov/shigella/index.html>> [cit. 19. 3. 2020]
- (18) Khalil, I. A.; Troeger, C.; Blacker, B. F.; Rao, P. C.; Brown, A.; Atherly, D. E.; Brewer, T. G.; Engmann, C. M.; Houpt, E. R.; Kang, G.; Kotloff, K. L.; Levine, M. M.; Luby, S. P.; MacLennan, C. A.; Pan, W. K.; Pavlinac, P. B.; Platts-Mills, J. A.; Qadri, F.; Riddle, M. S.; Ryan, E. T.; Shoultz, D. A.; Steele, A. D.; Walson, J. L.; Sanders, J. W.; Mokdad, A. H.; Murray, C. J. L.; Hay, S. I.; Reiner, R. C. Morbidity and Mortality Due to *Shigella* and Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Diarrhoea: The Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18* (11), 1229–1240.

- 
- (19) Bowen, A.; Hurd, J.; Hoover, C.; Khachadourian, Y.; Traphagen, E.; Harvey, E.; Libby, T.; Ehlers, S.; Ongpin, M.; Norton, J. C.; Bicknese, A.; Kimura, A. Importation and Domestic Transmission of *Shigella* Sonnei Resistant to Ciprofloxacin — United States, May 2014–February 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2015**, *64* (12), 318–320.
- (20) Gu, B.; Cao, Y.; Pan, S.; Zhuang, L.; Yu, R.; Peng, Z.; Qian, H.; Wei, Y.; Zhao, L.; Liu, G.; Tong, M. Comparison of the Prevalence and Changing Resistance to Nalidixic Acid and Ciprofloxacin of *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2009. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *40* (1), 9–17.
- (21) Ud-Din, A. I. M. S.; Wahid, S. U. H.; Latif, H. A.; Shahnaiz, M.; Akter, M.; Azmi, I. J.; Hasan, T. N.; Ahmed, D.; Hossain, M. A.; Faruque, A. S. G.; Faruque, S. M.; Talukder, K. A. Changing Trends in the Prevalence of *Shigella* Species: Emergence of Multi-Drug Resistant *Shigella* Sonnei Biotype g in Bangladesh. *PLoS One* **2013**, *8* (12), e82601.
- (22) Bhattacharya, D.; Bhattacharya, H.; Thamizhmani, R.; Sayi, D. S.; Reesu, R.; Anwesh, M.; Kartick, C.; Bharadwaj, A. P.; Singhanian, M.; Sugunan, A. P.; Roy, S. Shigellosis in Bay of Bengal Islands, India: Clinical and Seasonal Patterns, Surveillance of Antibiotic Susceptibility Patterns, and Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Shigella* Strains Isolated during a 6-Year Period from 2006 to 2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33* (2), 157–170.
- (23) Ashkenazi, S.; Levy, I.; Kazaronovski, V.; Samra, Z. Growing Antimicrobial Resistance of *Shigella* Isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (2), 427–429.
- (24) DuPont, H. L.; Hornick, R. B. Adverse Effect of Lomotil Therapy in Shigellosis. *JAMA* **1973**, *226* (13), 1525–1528.
- (25) Mani, S.; Wierzba, T.; Walker, R. I. Status of Vaccine Research and Development for *Shigella*. *Vaccine* **2016**, *34* (26), 2887–2894.
- (26) Hohn, C. Inhibitors of tRNA–Guanine Transglycosylase: From Lin-Benzopurines to Transition State and Nucleobase Analogues. *ETH Zürich* **2015**, *Ph.D. Thesis* (DISS. ETH No. 23162).
- (27) Davis, F. F.; Allen, F. W. Ribonucleic Acids from Yeast Which Contain a Fifth Nucleotide. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227* (2), 907–915.

- 
- (28) Smith, J. D.; Dunn, D. B. The Occurrence of Methylated Guanines in Ribonucleic Acids from Several Sources. *Biochem. J.* **1959**, *72* (2), 294–301.
- (29) University at Albany, State University of New York: *The RNA Institute* [online]. Dostupné z URL: <<https://mods.rna.albany.edu/>> [cit. 20. 3. 2020]
- (30) Agris, P. F. The Importance of Being Modified: Roles of Modified Nucleosides and Mg<sup>2+</sup> in RNA Structure and Function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1996**, *53*, 79–129.
- (31) Weixlbaumer, A.; Murphy, F. V.; Dziergowska, A.; Malkiewicz, A.; Vendeix, F. A. P.; Agris, P. F.; Ramakrishnan, V. Mechanism for Expanding the Decoding Capacity of Transfer RNAs by Modification of Uridines. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (6), 498–502.
- (32) Bjork, G. R.; Hagervall, T. G. Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function. *EcoSal Plus* **2014**, *6* (1), 1–68.
- (33) Crick, F. H. Codon--Anticodon Pairing: The Wobble Hypothesis. *J. Mol. Biol.* **1966**, *19* (2), 548–555.
- (34) Agris, P. F. Decoding the Genome: A Modified View. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (1), 223–238.
- (35) Agris, P. F. Wobble Position Modified Nucleosides Evolved to Select Transfer RNA Codon Recognition: A Modified-Wobble Hypothesis. *Biochimie* **1991**, *73* (11), 1345–1349.
- (36) Goffena, J.; Lefcort, F.; Zhang, Y.; Lehrmann, E.; Chaverra, M.; Felig, J.; Walters, J.; Buksch, R.; Becker, K. G.; George, L. Elongator and Codon Bias Regulate Protein Levels in Mammalian Peripheral Neurons. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (889), 1–10.
- (37) Morris, R. C.; Brown, K. G.; Elliott, M. S. The Effect of Queuosine on tRNA Structure and Function. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, *16* (4), 757–774.
- (38) Kuchino, Y.; Borek, E.; Grunberger, D.; Mushinski, J. F.; Nishimura, S. Changes of Post-Transcriptional Modification of Wye Base in Tumor-Specific tRNA Phe. *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10* (20), 6421–6432.
- (39) McCarty, R. M.; Somogyi, A.; Bandarian, V. Escherichia Coli QueD Is a 6-Carboxy-5,6,7,8-Tetrahydropterin Synthase. *Biochemistry* **2009**, *48* (11), 2301–2303.

- 
- (40) Van Lanen, S. G.; Reader, J. S.; Swairjo, M. A.; de Crecy-Lagard, V.; Lee, B.; Iwata-Reuyl, D. From Cyclohydrolase to Oxidoreductase: Discovery of Nitrile Reductase Activity in a Common Fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (12), 4264–4269.
- (41) Okada, N.; Nishimura, S. Isolation and Characterization of a Guanine Insertion Enzyme, a Specific tRNA Transglycosylase, from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (8), 3061–3066.
- (42) Okada, N.; Harada, F.; Nishimura, S. Specific Replacement of Q Base in the Anticodon of tRNA by Guanine Catalyzed by a Cell-Free Extract of Rabbit Reticulocytes. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3* (10), 2593–2603.
- (43) Frey, B.; McCloskey, J.; Kersten, W.; Kersten, H. New Function of Vitamin B12: Cobamide-Dependent Reduction of Epoxyqueuosine to Queuosine in tRNAs of *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1988**, *170* (5), 2078–2082.
- (44) Grädler, U.; Gerber, H. D.; Goodenough-Lashua, D. A. M.; Garcia, G. A.; Ficner, R.; Reuter, K.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. A New Target for Shigellosis: Rational Design and Crystallographic Studies of Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306* (3), 455–467.
- (45) Ehrmann, F. R.; Stojko, J.; Metz, A.; Debaene, F.; Barandun, L. J.; Heine, A.; Diederich, F.; Cianférani, S.; Reuter, K.; Klebe, G. Soaking Suggests “Alternative Facts”: Only Co-Crystallization Discloses Major Ligand-Induced Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein Indicating a Novel Mode-of-Inhibition. *PLoS One* **2017**, *12* (4), e0175723.
- (46) Stengl, B.; Reuter, K.; Klebe, G. Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes from the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism. *ChemBioChem* **2005**, *6* (11), 1926–1939.
- (47) Sansonetti, P. J. War and Peace at Mucosal Surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4* (12), 953–964.
- (48) Durand, J. M.; Okada, N.; Tobe, T.; Watarai, M.; Fukuda, I.; Suzuki, T.; Nakata, N.; Komatsu, K.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. VacC, a Virulence-Associated Chromosomal Locus of *Shigella Flexneri*, Is Homologous to Tgt, a Gene



- 
- Encoding tRNA-Guanine Transglycosylase (Tgt) of Escherichia Coli K-12. *J. Bacteriol.* **1994**, 176 (15), 4627–4634.
- (49) Okada, N.; Nishimura, S. Isolation and Characterization of a Guanine Insertion Enzyme, a Specific tRNA Transglycosylase, from Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (8), 3061–3066.
- (50) Durand, J. M.; Dagberg, B.; Uhlin, B. E.; Bjork, G. R. Transfer RNA Modification, Temperature and DNA Superhelicity Have a Common Target in the Regulatory Network of the Virulence of Shigella Flexneri: The Expression of the VirF Gene. *Mol. Microbiol.* **2000**, 35 (4), 924–935.
- (51) Durand, J. M.; Bjork, G. R.; Kuwae, A.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. The Modified Nucleoside 2-Methylthio-N6-Isopentenyladenosine in tRNA of Shigella Flexneri Is Required for Expression of Virulence Genes. *J. Bacteriol.* **1997**, 179 (18), 5777–5782.
- (52) Brenk, R.; Meyer, E. A.; Reuter, K.; Stubbs, M. T.; Garcia, G. A.; Diederich, F.; Klebe, G. Crystallographic Study of Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase Suggests a New Structure-Based Pharmacophore for Virtual Screening. *J. Mol. Biol.* **2004**, 338 (1), 55–75.
- (53) Brenk, R.; Stubbs, M. T.; Heine, A.; Reuter, K.; Klebe, G. Flexible Adaptations in the Structure of the tRNA-Modifying Enzyme tRNA-Guanine Transglycosylase and Their Implications for Substrate Selectivity, Reaction Mechanism and Structure-Based Drug Design. *Chembiochem* **2003**, 4 (10), 1066–1077.
- (54) Goodenough-Lashua, D. M.; Garcia, G. A. tRNA-Guanine Transglycosylase from E. Coli: A Ping-Pong Kinetic Mechanism Is Consistent with Nucleophilic Catalysis. *Bioorg. Chem.* **2003**, 31 (4), 331–344.
- (55) Xie, W.; Liu, X.; Huang, R. H. Chemical Trapping and Crystal Structure of a Catalytic tRNA Guanine Transglycosylase Covalent Intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10 (10), 781–788.
- (56) Hurt, J. K.; Olgen, S.; Garcia, G. A. Site-Specific Modification of Shigella Flexneri VirF mRNA by tRNA-Guanine Transglycosylase in Vitro. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35 (14), 4905–4913.

- 
- (57) Meyer, E. A.; Furler, M.; Diederich, F.; Brenk, R.; Klebe, G. Synthesis and in Vitro Evaluation of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-One-Based Inhibitors for tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87 (6), 1333–1356.
- (58) Meyer, E. A.; Brenk, R.; Castellano, R. K.; Furler, M.; Klebe, G.; Diederich, F. De Novo Design, Synthesis, and in Vitro Evaluation of Inhibitors for Prokaryotic tRNA-Guanine Transglycosylase: A Dramatic Sulfur Effect on Binding Affinity. *ChemBioChem* **2002**, 3 (2–3), 250—253.
- (59) Rajappan, V.; Schneller, S. An 8-Aminoimidazo[4,5-g]Quinazoline Carbocyclic Nucleoside: A Ring-Extended Analog of 5'-Noraristeromycin. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9049–9053.
- (60) Rotella, D. P.; Sun, Z.; Zhu, Y.; Krupinski, J.; Pongrac, R.; Seliger, L.; Normandin, D.; Macor, J. E. Optimization of Substituted N-3-Benzylimidazoquinazolinone Sulfonamides as Potent and Selective PDE5 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, 43 (26), 5037–5043.
- (61) Meyer, E. A.; Donati, N.; Guillot, M.; Schweizer, W. B.; Diederich, F.; Stengl, B.; Brenk, R.; Reuter, K.; Klebe, G. Synthesis, Biological Evaluation, and Crystallographic Studies of Extended Guanine-Based (Lin-Benzoguanine) Inhibitors for tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta* **2006**, 89, 573–597.
- (62) Barandun, L. J.; Immekus, F.; Kohler, P. C.; Ritschel, T.; Heine, A.; Orlando, P.; Klebe, G.; Diederich, F. High-Affinity Inhibitors of *Zymomonas Mobilis* tRNA-Guanine Transglycosylase through Convergent Optimization. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, D69, 1798–1807.
- (63) Barandun, L. J.; Immekus, F.; Kohler, P. C.; Tonazzi, S.; Wagner, B.; Wendelspiess, S.; Ritschel, T.; Heine, A.; Kansy, M.; Klebe, G.; Diederich, F. From Lin-Benzoguanines to Lin-Benzohypoxanthines as Ligands for *Zymomonas Mobilis* TRNA-Guanine Transglycosylase: Replacement of Protein-Ligand Hydrogen Bonding by Importing Water Clusters. *Chem. – Eur. J.* **2012**, 18, 9246–9257.
- (64) Stengl, B.; Meyer, E. A.; Heine, A.; Brenk, R.; Diederich, F.; Klebe, G. Crystal Structures of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) in Complex with Novel and

- 
- Potent Inhibitors Unravel Pronounced Induced-Fit Adaptations and Suggest Dimer Formation upon Substrate Binding. *J. Mol. Biol.* **2007**, *370* (3), 492–511.
- (65) Kohler, P. C.; Ritschel, T.; Bernd Schweizer, W.; Klebe, G.; Diederich, F. High-Affinity Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase Replacing the Function of a Structural Water Cluster. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 10809–10817.
- (66) Movsisyan, L. D.; Schäfer, E.; Nguyen, A.; Ehrmann, F. R.; Schwab, A.; Rossolini, T.; Zimmerli, D.; Wagner, B.; Daff, H.; Heine, A.; Klebe, G.; Diederich, F. Sugar Acetonides Are a Superior Motif for Addressing the Large, Solvent-Exposed Ribose-33 Pocket of tRNA-Guanine Transglycosylase. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (39), 9957–9967.
- (67) Brenk, R.; Meyer, E. A.; Reuter, K.; Stubbs, M. T.; Garcia, G. A.; Diederich, F.; Klebe, G. Crystallographic Study of Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase Suggests a New Structure-Based Pharmacophore for Virtual Screening. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338* (1), 55–75.
- (68) Modnikova, G. A.; Titkova, R. M.; Glushkov, R. G.; Sokolova, A. S.; Silin, V. A.; Chernov, V. A. Synthesis and Biological Activity of Aminopyrrolo[3,2-*d*]pyrimidines. *Pharm. Chem. J. (Eng. Ed.)* **1988**, *22*, 135–141.
- (69) Norman, M. H.; Chen, N.; Chen, Z.; Fotsch, C.; Hale, C.; Han, N.; Hurt, R.; Jenkins, T.; Kincaid, J.; Liu, L.; Lu, Y.; Moreno, O.; Santora, V. J.; Sonnenberg, J. D.; Karbon, W. Structure–Activity Relationships of a Series of Pyrrolo[3,2-*d*]Pyrimidine Derivatives and Related Compounds as Neuropeptide Y5 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (22), 4288–4312.
- (70) Klečka, M.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Hocek, M. Direct C-H Borylation and C-H Arylation of Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines: Synthesis of 6,8-Disubstituted 7-Deazapurines. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 866–868.
- (71) Hocek, M.; Pohl, R. Regioselectivity in Cross-Coupling Reactions of 2,6,8-Trichloro-9-(Tetrahydropyran-2-yl)Purine: Synthesis of 2,6,8-Trisubstituted Purine Bases. *Synthesis* **2004**, *36* (17), 2869–2876.
- (72) Girgis, N. S.; Michael, M. A.; Smee, D. F.; Alaghamandan, H. A.; Robins, R. K.; Cottam, H. B. Direct C-Glycosylation of Guanine Analogues: The Synthesis and Antiviral Activity of Certain 7- and 9-Deazaguanine C-Nucleosides. *J. Med. Chem.* **1990**, *33* (10), 2750–2755.

- 
- (73) Bauwens M. Synthesis of novel tRNA-guanine transglycosylase inhibitors to target Shigellosis. Antverpy, **2018**. Departement Farmaceutische Wetenschappen, Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige Wetenschappen. Diplomová práce.
- (74) Chen, X.; Kopecky, D. J.; Mihalic, J.; Jeffries, S.; Min, X.; Heath, J.; Deignan, J.; Lai, S.; Fu, Z.; Guimaraes, C.; Shen, S.; Li, S.; Johnstone, S.; Thibault, S.; Xu, H.; Cardozo, M.; Shen, W.; Walker, N.; Kayser, F.; Wang, Z. Structure-Guided Design, Synthesis, and Evaluation of Guanine-Derived Inhibitors of the EIF4E mRNA-Cap Interaction. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (8), 3837–3851.
- (75) Bhujabal, Y. B.; Vadagaonkar, K. S.; Gholap, A.; Sanghvi, Y. S.; Dandela, R.; Kapdi, A. R. HFIP Promoted Low-Temperature SNAr of Chloroheteroarenes Using Thiols and Amines. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (23), 15343–15354.
- (76) Kaspersen, S. J.; Han, J.; Nørsett, K. G.; Rydså, L.; Kjøbli, E.; Bugge, S.; Bjørkøy, G.; Sundby, E.; Hoff, B. H. Identification of New 4-N-Substituted 6-Aryl-7H-Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine-4- Amines as Highly Potent EGFR-TK Inhibitors with Src-Family Activity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *59* (1), 69–82.
- (77) Mayasundari, A.; Fujii, N. Efficient Formation of 4,6-Disubstituted Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines: A Novel Route to TWS119, a Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (27), 3597–3598.
- (78) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; **1999**.
- (79) Lin, Q.; Meloni, D.; Pan, Y.; Xia, M.; Rodgers, J.; Shepard, S.; Li, M.; Galya, L.; Metcalf, B.; Yue, T. N.; Liu, P.; Zhou, J. Enantioselective Synthesis of Janus Kinase Inhibitor INCB018424 via an Organocatalytic Aza-Michael Reaction. *Org. Lett.* **2009**, *11* (9), 1999–2002.
- (80) Heppollette, R. L.; Miller, J. The SN Mechanism in Aromatic Compounds. V. Halogen Substituents. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (17), 4265–4268.